

When plants were inoculated by a viruliferous thrips for 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 or 8 days, the number of newborn larvae, which could transmit, increased with the length of the inoculation period. Most plants became infected, and an average of 40% newborn larvae collected on the infected plants transmitted the virus when they become adult.

Partial infection of the larvae was also demonstrated when plants were inoculated by five viruliferous thrips in a five day-long inoculation access period. Only a percentage increasing from 20 to 50% of the adults, reared from the larvae born in a fortnight after infection of the plant, became transmitters.

These result shows that several thrips, although born on an infected plant fail to become transmitters.

Functionele analyse van genen betrokken bij resistentie met behulp van virus-geïnduceerde gen silencing

P-45

*S. Gabriëls, J. Vossen, G. van den Berg,
A. Abd-El-Haliem, P. de Wit en M. Joosten*

*Laboratorium voor Fytopathologie, Wageningen Universiteit,
Binnenhaven 5, 6709 PD Wageningen*

Onze onderzoeksgroep is geïnteresseerd in de resistentie reactie van planten tegen ziekteverwekkers. Als modelsysteem gebruiken wij de interactie tussen tomaat en de schimmel *Cladosporium fulvum*. Een aantal resistentiegenen (*Cf* genen) tegen *Cladosporium* is gekloneerd. Een van deze genen is *Cf-4*, welke zorg draagt voor de herkenning van het avirulentie-eiwit Avr4 van *C. fulvum*. Na *Cf4-Avr4* herkenning sterven een paar cellen rond de infectieplaats af om verdere groei van de schimmel te voorkomen. Dit fenomeen wordt een overgevoeligheidsreactie of HR genoemd.

Nu de resistentiegenen gekloneerd zijn is ons doel andere genen betrokken bij resistentie te identificeren. Met behulp van cDNA-AFLP analyse zijn 420 cDNA fragmenten geïdentificeerd waarvan de expressie verandert tijdens de HR (Avr-Responsive Tomato; ART genen genoemd). Van deze 420 cDNA fragmenten zijn er 192 geselecteerd voor verdere functionele analyse via virus-geïnduceerde gen silencing (VIGS). Voor VIGS gebruiken we een tabaksratelvirus (TRV) vector waarin elk van de 192 fragmenten gekloneerd is. Inoculatie van planten met deze recombinante TRV vector leidt tot VIGS, waarbij de expressie van het endogene gen van de plant corresponderend met het cDNA fragment in de TRV vector, wordt onderdrukt.

Op deze manier hebben we 192 “knock-downs” gemaakt in *N. benthamiana* welke getransformeerd is met *Cf-4* (*N. benthamiana:Cf-4*). Deze “knock-downs” hebben we getest voor hun vermogen om de Avr4-geïnduceerde HR te onderdrukken. Naast onze controle (een “knock-down” van *Cf-4* zelf), vonden we ook dat VIGS van onder meer een gen coderend voor een GTPase aanwezig in de kern, en een resistentie eiwit analoog (een CC-NBS-LRR eiwit), leidt tot onderdrukking van de HR.

Om te testen of deze genen ook betrokken zijn bij *C. fulvum* resistentie, hebben we ook VIGS experimenten uitgevoerd in resistente tomatenplanten. Deze “knock-down” tomatenplanten werden geïnoculeerd met *C. fulvum* welke het GUS gen tot expressie brengt. Vervolgens is er gescoord op aanwezigheid van blauwe *C. fulvum* hyfen, duidend op kolonisatie van het blad en dus verminderde resistentie. Naast onze controle (VIGS van *Cf-4*) vonden we dat “knock-down” van het CC-NBS-LRR-coderend gen en van een gen coderend voor een RLK (Receptor Like Kinase) leidt tot verminderde resistentie.

Uiteindelijk hebben we ook getest of deze genen specifiek zijn voor de *Cf4-Avr4*-gerelateerde HR of dat ze ook betrokken zijn bij de *Rx* (resistentie tegen PVX)-afhankelijke HR. Zoals verwacht heeft VIGS van *Cf-4* enkel effect op de *Cf4-Avr4*-gerelateerde HR, terwijl “knock-down” van het CC-NBS-LRR-coderend gen en de RLK zowel de *Cf4-Avr4*- als de *Rx*-gerelateerde HR onderdrukt.

We kunnen concluderen dat functionele analyse van 192 ART genen met behulp van VIGS in *N. benthamiana* en tomaat tot nu toe heeft geleid tot de identificatie van een aantal genen betrokken bij de HR en *C. fulvum* resistentie. Bovendien zijn er ook genen geïdentificeerd die bij HR geïnduceerd door verschillende ziekteverwekkers betrokken zijn. Identificatie van additionele genen betrokken bij resistentie helpt ons niet alleen het resistentiemechanisme beter te begrijpen, maar kan ook bijdragen aan het verkrijgen van een meer duurzame resistentie en het identificeren van targets voor gewasbescherming.